植 物 分 类 学 报 45 (6): 783–795 (2007) doi:10.1360/aps06058
Acta Phytotaxonomica Sinica http://www.plantsystematics.com

基于ITS序列的东亚当归属植物的分类学研究

[1]薛华杰 [1]闫茂华 [1]陆长梅* [2]王年鹤 [1]吴国荣
[1](南京师范大学生命科学学院 南京 210097)
[2](江苏省中国科学院植物研究所 南京 210014)

Taxonomic study of *Angelica* from East Asia: Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA

[1]XUE Hua-Jie [1]YAN Mao-Hua [1]LU Chang-Mei* [2]WANG Nian-He [1]WU Guo-Rong
[1](*College of Life Sciences, Nanjing Normal University*, Nanjing 210097, China)
[2](*Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences*, Nanjing 210014, China)

Abstract In order to resolve the relationships among species from *Angelica* s.s. and its allied genera in East Asia, ITS (Internal Transcribed Spacer) sequences of 44 taxa were used to analyze their sequence divergence and to construct three phylogenetic trees in this paper. Three taxa were used as the outgroup. Some conclusions could be achieved as follows. (1) *Angelica* s.s., *Czernaevia*, and *Coelopleurum* were closely related, but the relationship between *Ostericum* and them was ulterior. It was also supported by analyses on fruit anatomy and chemical constitutes. *Ostericum* was proposed as a relatively independent genus. (2) Results from ITS sequences supported the view that *Angelica* s.s. was monophyletic and could be divided into several sections. (3) Results from ITS sequences and chemical constitutes indicated that the relationship between *Peucedanum* and *Angelica* s.s. was very close. (4) Results from ITS sequences as well as from conformation and chemical constitutes showed that the divergence of *A. sinensis* from other taxa of *Angelica* s.s. was great. The taxonomic position of *A. sinensis* should be reconsidered. (5) Both analyses of ITS sequences and chemical constitutes revealed that *Ligusticum* was not a natural group.

Key words East Asia, *Angelica*, ITS sequence, molecular phylogeny.

摘要 采用PCR直接测序法，测定了东亚地区狭义当归属*Angelica* s.s.及其近缘共7属40种代表植物的核糖体DNA ITS序列，并结合GenBank中相关植物的ITS序列(含外类群3种)，应用遗传距离与系统树分析法对东亚地区狭义当归属植物内部以及当归属与其近缘属植物之间的亲缘关系进行了分析。结果表明: (1) 广义当归属中的狭义当归属、柳叶芹属*Czernaevia*和高山芹属*Coelopleurum*之间的亲缘关系较近，山芹属*Ostericum*与它们的亲缘关系较远，这与果实形态、化学分析的结果一致，建议将山芹属作为一个相对独立的分类群处理。(2) ITS序列分析结果支持狭义当归属不是单起源的自然分类群，而应该被分成若干组的观点。(3) ITS序列以及化学成分分析结果表明，前胡属*Peucedanum*与狭义当归属之间的亲缘关系很近。(4) 形态、化学成分以及ITS等多方面分析结果显示，当归*A. sinensis*与狭义当归属的多数植物之间均有一定的差距，其归属问题值得商榷。(5) ITS序列与化学成分的分析结果均显示藁本属*Ligusticum*不是一个自然类群。

关键词 东亚；当归属；ITS序列；亲缘关系

2006-03-29 收稿, 2007-01-19 收修改稿。
基金项目：国家自然科学基金(30270097)(Supported by the National Natural Science Foundation of China, Grant No. 30270097)。
* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: luchangmei@njnu.edu.cn)。

当归属*Angelica* L.隶属于伞形科Umbelliferae芹亚科Apioideae前胡族Peucedaneae当归亚族Angelicinae，由林奈建立于1753年。迄今为止，其所含的某些分类群的分与合，不同国家的学者持有不同的观点。有的主张将某些类群从当归属中分离出来，作为数个独立的属存在(陈晓亚, 1989)，《中国植物志》(单人骅，佘孟兰, 1992)和《Flora of China》(Pan & Watson, 2005)将山芹属*Ostericum* Maxim.、高山芹属*Coelopleurum* Ledeb.、柳叶芹属*Czernaevia* Turcz.和古当归属*Archangelica* Hoffm.等4个类群独立成属，而将余下的种仍保留在当归属，一般称之为狭义当归属*Angelica* s.s. (袁昌齐，单人骅，1983; 单人骅，佘孟兰, 1992; Pan & Watson, 2005)。有的则主张将以上各属作为一个当归属处理(Hiroe & Constance, 1958; Constance, 1994)，一般称之为广义当归属*Angelica* s.l.。

近20年来的研究表明，即使是狭义当归属，也仍然不是一个单起源的自然分类群(王年鹤, 1990; Katz-Downie et al., 1999; Downie et al., 2001a, b; Plunkett & Lowry, 2001; Sun et al., 2004); Downie等(2001b)综合了叶绿体基因组DNA序列(包括*rbc*L、*mat*K、*rpl*16、*rps*16和*rpo*C1)和核基因组ITS序列等方面的分子生物学研究结果，表明其实验所涉及的12种欧美当归属植物与前胡属*Peucedanum* L.、西风芹属*Seseli* L.等另十多个属的植物相混杂，被分散在若干个次级分支中，但是他们的研究仅是在对伞形科芹亚科植物的广泛研究时稍有涉及，而没有对当归属植物进行专门的研究。因此可以看出，由于所采集材料的分布区域、所采用的分析手段以及实验所选分类群数的有限性，对当归属的分类问题目前仍未能提供充分的资料解决，各属之间的关系以及它们之间自然分类群的划分等问题，目前依然非常混乱。

广义当归属植物全世界约120种，东亚分布60多种，北美约30种，欧洲12种，其他地区有少数种类分布；狭义当归属植物全世界约90种，东亚分布50种以上。显然东亚是世界当归属植物的分布中心，而中国和日本又是东亚地区当归属植物种类分布较多的区域。中国产狭义当归属植物45种(其中少数为非东亚分布种类)，含特有种31种；日本狭义当归属植物21种，含特有种13种。因此对中日两国以及少量韩国的当归属植物的研究，应当可以建立起东亚当归属植物的分类学基本框架，并为世界当归属植物的科学分类奠定基础。

由于在被子植物中，核基因组的ITS区(包括ITS1和ITS2)具有长度的高度保守性，使得这些间隔区的DNA序列较为容易排序，而相对其他常用的片段(如*mat*K、*rbc*L等)的高度变异性又使得该序列较适合于属内及属间的分类研究(Downie et al., 1996; 2001a, b; Douzery et al., 1999)。鉴于以上原因，本文选取中国、日本及韩国等东亚地区广泛分布的狭义当归属及其近缘属(包括广义当归属中的其他小属)共7属44种代表植物，以天胡荽亚科Hydrocotyloideae天胡荽属*Hydrocotyle* L.的*H. bonariensis* Comm. ex Lam.和积雪草属*Centella* L.的积雪草*C. asiatica* (L.) Urban以及变豆菜亚科Saniculoideae变豆菜属*Sanicula* L.的变豆菜*S. chinensis* Bunge作为外类群，主要根据ITS序列并结合形态与化学等分类依据，探讨东亚广义当归属植物之间的分类关系，以期初步建立一个东亚当归属植物的分类学基本框架。

1　材料和方法

1.1　材料

所用材料包括7属40种代表植物，分别来自东亚地区的中国与日本。其中38种代表植物由江苏省中国科学院植物研究所的王年鹤研究员采集并鉴定；2种代表植物由该所的徐增莱副研究员采集，王年鹤研究员鉴定，具体凭证标本号与材料采集地详见表1。另有7种植物的ITS序列来自GenBank。

表1　用于ITS序列分析的植物材料来源、凭证标本与GenBank登录号

Table 1　Taxa and voucher numbers used for this study and their GenBank accession numbers

No.	种名 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	GenBank登录号 GenBank accession
1	东当归 *Angelica acutiloba* (Sieb. & Zucc.) Kitag.	日本大阪药科大学药用植物园 Medicinal Plants Garden, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200424 (NAS)	DQ278165
2	黑水当归 *A. amurensis* Schischk	中国吉林长白山 Mt. Changbaishan, Jilin, China	王年鹤(N. H. Wang) 200404 (NAS)	DQ263581
3	阿坝当归 *A. apaensis* Shan & Yuan	中国四川康定 Kangding, Sichuan, China	王年鹤(N. H. Wang) 200409 (NAS)	DQ263583
4	*A.* sp.[1)]	中国云南丽江 Lijiang, Yunnan, China	王年鹤(N. H. Wang) 200423 (NAS)	DQ263588
5	重齿当归 *A. biserrata* (R. H. Shan & C. Q. Yuan) C. Q. Yuan & R. H. Shan	中国浙江天目山 Mt. Tianmushan, Zhejiang, China	王年鹤(N. H. Wang) 200501 (NAS)	DQ270207
6	长鞘当归 *A. cartilaginomarginata* Makino ex Yabe Nakai var. *foliosa* Yuan & Shan	中国江苏南京中山植物园 Nanjing Botanical Garden, Mem. Sun Yat-Sen, Jiangsu, China	王年鹤(N. H. Wang) 200425 (NAS)	DQ263589
7	兴安白芷 *A. dahurica* (Fischer ex Hoffmann) Benth. & Hook. f. ex Franch. & Sav.	日本大阪药科大学药用植物园 Medicinal Plants Garden, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200426 (NAS)	DQ278167
8	紫花前胡 *A. decursiva* (Miq.) Franch. & Sav.	日本大阪药科大学药用植物园 Medicinal Plants Garden, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200427(NAS)	DQ263563
9	鸭巴前胡 *A. decursiva* f. *albiflora* (Maxim.) Nakai	中国吉林长白山 Mt. Changbaishan, Jilin, China	王年鹤(N. H. Wang) 200405 (NAS)	DQ263579
10	*A. furcijuga* Kitaga.	日本大阪药科大学药用植物园 Medicinal Plants Garden, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200423 (NAS)	DQ278164
11	*A. genuflexa* Nuttall	日本北海道津顿别 Hamatonbetsu, Hokkaido, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200430 (NAS)	DQ263566
12	朝鲜当归 *A. gigas* Nakai	中国吉林长白山 Mt. Changbaishan, Jilin, China	王年鹤(N. H. Wang) 200407 (NAS)	DQ263580
13	*A. japonica* A. Gray	日本大阪药科大学药用植物园 Medicinal Plants Garden, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200425 (NAS)	DQ278166

表1 (续) **Table 1** (continued)

No.	种名 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	GenBank登录号 GenBank accession
14	康定当归 *A. kangdingensis* Shan & Pu	中国四川康定 Kangding, Sichuan, China	王年鹤(N. H. Wang) 200411 (NAS)	DQ263584
15	明日叶 *A. keiskei* (Miq.) Koidz.	日本八丈岛 Oshima, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200422 (NAS)	DQ263562
16	疏叶当归 *A. laxifoliata* Diels	中国四川九寨沟 Jiuzhaigou, Sichuan, China	王年鹤(N. H. Wang) 200419 (NAS)	DQ263586
17	丽江当归 *A. likiangensis* Wolff	中国云南丽江 Lijiang, Yunnan, China	王年鹤(N. H. Wang) 200421 (NAS)	DQ263587
18	茂汶当归 *A. maowenensis* Yuan & Shan	中国四川小金 Xiaojin, Sichuan, China	王年鹤(N. H. Wang) 200414 (NAS)	DQ263585
19	大叶当归 *A. megaphylla* Diels	中国重庆金佛山 Mt. Jinfoshan, Chongqing, China	王年鹤(N. H. Wang) 2000310 (NAS)	DQ263568
20	福参 *A. morii* Hayata	中国福建武夷山 Mt. Wuyishan, Fujian, China	王年鹤(N. H. Wang) 200402 (NAS)	DQ263578
21	青海当归 *A. nitida* Wolff	中国青海玛曲 Maqu, Qinghai, China	徐增莱(Z .L. Xu) 483 (NAS)	DQ263592
22	峨眉当归 *A. omeiensis* Yuan & Shan	中国四川峨眉山 Mt. Emeishan, Sichuan, China	王年鹤(N. H. Wang) 2000316 (NAS)	DQ263576
23	拐芹 *A. polymorpha* Maxim.	中国江苏南京中山植物园 Nanjing Botanical Garden, Mem. Sun Yat-Sen, Jiangsu, China	王年鹤(N. H. Wang) 200426 (NAS)	DQ263590
24	*A. pubescens* Maxim.	日本大阪萩谷 Hakitani, Osaka, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200431 (NAS)	DQ263567
25	*A. purpureifolia* Chuang	GenBank/韩国 GenBank/Korea		AY548229
26	*A. sachalinensis* Maxim.	日本北海道津顿别 Hamatonbetsu, Hokkaido, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200428 (NAS)	DQ263564
27	当归 *A. sinensis* (Oliver) Diels	中国四川宝兴 Baoxing, Sichuan, China	王年鹤(N. H. Wang) 200314 (NAS)	DQ263570
28	*A. tenuissima* Nakai	GenBank/韩国 GenBank/ Korea		AF455750 AY548215
29	天目当归 *A. tianmuensis* Z. H. Pan	中国浙江天目山 Mt. Tianmushan, Zhejiang, China	徐增莱(Z. L. Xu) 501 (NAS)	DQ270194
30	*A. ursine* (Rupr.) Maxim.	日本北海道津顿别 Mt. Hamatonbetsu, Hokkaido, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200429 (NAS)	DQ263565
31	金山当归 *A. valida* Diels	中国重庆金佛山 Jinfoshan, Chongqing, China	王年鹤(N. H. Wang) 200306 (NAS)	DQ263569
32	*Coelopleurum lucidum* Fernald	日本北海道津顿别 Mt. Hamatonbetsu, Hokkaido, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200332 (NAS)	DQ270196
33	高山芹 *C. saxatile* (Turcz. ex Ledeb.) Drude	中国吉林长白山 Mt. Changbaishan, Jilin, China	王年鹤(N. H. Wang) 200406 (NAS)	DQ270195
34	柳叶芹 *Czernaevia laevigata* Turcz.	中国吉林长白山 Mt. Changbaishan, Jilin, China	王年鹤(N. H. Wang) 200408 (NAS)	DQ270197
35	*Heracleum moellendorffii* Hance	GenBank/韩国 GenBank/Korea		AY548226
36	狭翅独活 *H. stenopterum* Diels	中国云南丽江 Lijiang, Yunnan, China	王年鹤(N. H. Wang) 200420 (NAS)	DQ270203
37	川防风 *Ligusticum brachylobum* Frachet	中国重庆金佛山 Mt. Jinfoshan, Chongqing, China	王年鹤(N. H. Wang) 200307 (NAS)	DQ270205
38	川芎 *L. sinense* ‘Chuanxiong’ S. H. Qiu et al.	中国重庆金佛山 Mt. Jinfoshan, Chongqing, China	王年鹤(N. H. Wang) 200301 (NAS)	DQ270204

表1 (续)　**Table 1** (continued)

No.	种名 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	GenBank登录号 GenBank accession
39	*L. hultenii* Fern.	日本北海道津顿别 Hamatonbetsu, Hokkaido, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200334 (NAS)	DQ270206
40	*L. jeholense* (Nakai & Kitag.) Nakai & Kitag.	GenBank/韩国 GenBank/ Korea		AY548218
41	大齿山芹 *Ostericum grosseserratum* (Maxim.) Kitag.	中国江苏南京中山植物园 Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen, Jiangsu, China	王年鹤(N. H. Wang) 200424 (NAS)	DQ270199
42	*Ostericum* sp.	中国云南丽江 Lijiang, Yunnan, China	王年鹤(N. H. Wang) 200424 (NAS)	DQ270198
43	华山前胡 *Peucedanum ledebourielloides* Franch.	中国陕西华山 Mt. Huashan, Shaanxi, China	王年鹤(N. H. Wang) 200320 (NAS)	DQ270200
44	滨海前胡 *P. japonicum* Thunb.	日本大阪药科大学药用植物园 Medicinal Plants Garden, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Japan	王年鹤(N. H. Wang) 200333 (NAS)	DQ270201
45*	积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban	GenBank/美国 GenBank/America		AF272352
46*	*Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam.	GenBank/俄罗斯 GenBank/Russia		AF077894
47*	变豆菜 *Sanicula chinensis* Bunge	GenBank/美国 GenBank/America		AF031965

1) GenBank上登录植物名为*A. baizhioides* (mss). *表示外类群。
1) Registered in the GenBank as *A. baizhioides* (mss). * represents the outgroup.

1.2　实验方法

1.2.1　植物总DNA的提取　基因组DNA的提取采用上海申能博采公司的3S Spin Plant基因组DNA提取试剂盒从硅胶干燥的叶片中提取。DNA浓度测定采用分光光度法, 并以电泳与EB染色后在紫外灯下观察辅助测定。提取的基因组DNA直接用于PCR扩增。

1.2.2　ITS区片段扩增与纯化　采用White等(1990)设计的ITS通用引物ITS4和ITS5, 按反应程序(预变性95 ℃ 5 min, 变性94 ℃ 1 min, 复性54 ℃ 1 min, 延伸 72 ℃ 1 min, 30个循环后延伸72 ℃ 10 min)进行PCR扩增, 得到核糖体DNA的ITS片段(包括ITS1、ITS2和5.8S)。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 并用DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒(申能博采公司)纯化。

1.2.3　DNA测序与ITS序列确定　纯化后的PCR产物直接用扩增引物测序。各属各分类群的ITS序列始末端的决定, 均参考了GenBank中各相关植物的ITS序列。它们各自的ITS序列已被GenBank收录, 具体登录号见表1。其中属于18S与26S的部分片段已被删除。每种植物至少进行了3次测序, 并将3次结果进行相互验证。

1.2.4　数据分析　所得序列用CLUSTAL X程序进行对位排列(Thompson et al., 1997), 并经手工校正。利用MEGA 3.1 软件对序列进行分析, 根据Kimura 2-parameter法计算各类群间的核苷酸差异值及差异矫正值(Kumar, 2004), 最后用PAUP4.0 beta 10 win软件对序列进行统计和分支分析(Swofford, 2003), 碱基处理作Fitch性状(无序), 空位(gap)作缺失(missing)状态分析。分别应用邻接法、最大简约法与最大似然法构建ITS系统树: 邻接树的构建使用Kimura距离; 最大简约树的构建使用启发式搜索, 树二等分再连接分支交换(TBR), 各种核苷酸替代同等加权; 最大似然树的构建使用HKY模式。所有自展分析

(bootstrap)重复1000次，以检验树拓扑结构的可靠性。

2 结果

2.1 各植物ITS的长度与GC百分含量比较

除外类群外，所有ITS1序列与ITS2序列排序后分析发现，ITS1部位的信息位点数为97/225 (43.11%), ITS2部位的为91/221 (41.18%)，两者相近。因此以下分析将ITS1和ITS2序列合并进行分析。文中所涉及的广义当归属与其他相关属植物的ITS序列长度与它们的GC百分含量见表2。由表2可见，所有植物的ITS序列长度相差不大，平均值均在437 bp左右; GC百分含量除独活属*Heracleum* L.稍小外，其他各属植物相差不大，平均值均在55%左右。由此可见，从ITS各区段序列长度与GC含量上比较，各属间差异不大。

表2 各属植物ITS(包括ITS1和ITS2)序列特征比较
Table 2 Sequence characteristics of ITS regions (including ITS1 and ITS2)

属 Genus	当归属 *Angelica* L.	高山芹属 *Coelopleurum* Ledeb.	柳叶芹属 *Czernaevia* Turcz.	独活属 *Heracleum* L.	藁本属 *Ligusticum* L.	山芹属 *Ostericum* Maxim.	前胡属 *Peucedanum* L.
Length range (nt) (mean)	436–440 (437)	436–437 (437)	437 (437)	439–440 (440)	434–436 (435)	440–441 (441)	438–440 (439)
Aligned length (nt)	442	437	437	440	436	441	440
% G & C content range (mean)	53.0–57.6 (55.4)	55.3–55.6 (55.5)	56.0 (56.0)	52.6–53.0 (52.8)	55.0–57.2 (55.8)	54.9–55.8 (55.4)	55.7–56.2 (56.0)

2.2 基于ITS序列分析各植物之间的遗传距离

除外类群外，所有代表植物的ITS合并序列经排序后其总长度为468 bp(包括空位)。基于该序列分析各属间的遗传距离值(表3)可见：狭义当归属与广义当归属中的高山芹属、柳叶芹属之间的遗传距离值均小于0.07，表明这3属间的亲缘关系很近，而山芹属与上述3个属间的遗传距离值均在0.25以上，显示山芹属与这3个属的亲缘关系较远；当归属、高山芹属以及柳叶芹属与广义当归属外的3属(包括前胡属、独活属和藁本属)间的遗传距离值反较它们与山芹属间的小，这从另一方面也显示山芹属与广义当归属其他小属间亲缘关系较远；前胡属与广义当归属内的当归属、高山芹属与柳叶芹属等的遗传距离值均小于0.1，显示前胡属与这三属之间的关系较近。

表3 基于ITS序列(包括ITS1和ITS2)比较各属植物间的相对遗传距离
Table 3 Sequence divergence of ITS sequence (including ITS1 and ITS2) between every two genera

	1	2	3	4	5	6	7
1 当归属*Angelica*	–						
2 高山芹属*Coelopleurum*	0.064						
3 柳叶芹属*Czernaevia*	0.064	0.048					
4 山芹属*Ostericum*	0.276	0.271	0.283				
5 独活属*Heracleum*	0.171	0.167	0.182	0.291			
6 藁本属*Ligusticum*	0.150	0.134	0.149	0.211	0.197		
7 前胡属*Peucedanum*	0.091	0.061	0.084	0.287	0.192	0.149	

2.3 分子系统树的比较和分析

基于ITS序列以*Hydrocotyle bonariensis*、积雪草和变豆菜作为外类群，通过邻接法、最大简约法和最大似然法构建NJ树、MP树和ML树，共得到3个系统树，具体见图1–3。

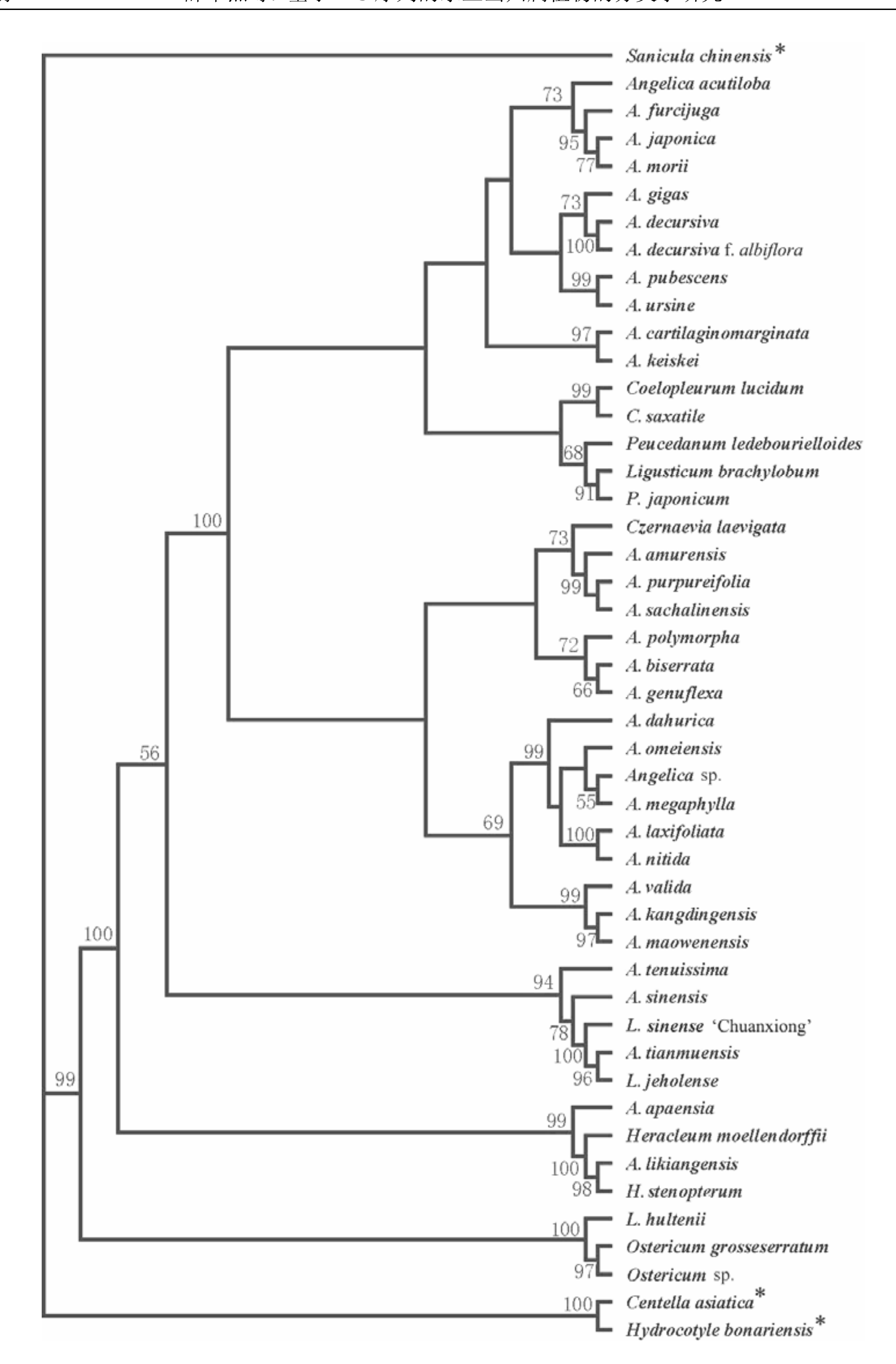


图1 用邻接法构建的ITS(包括ITS1和ITS2)系统树(数字表示各分支自展数据支持率, *表示外类群)

Fig. 1. ITS (including ITS1 and ITS2) phylogenetic tree using the neighbor-joining method. Numbers are bootstrap values. * represents the outgroup.

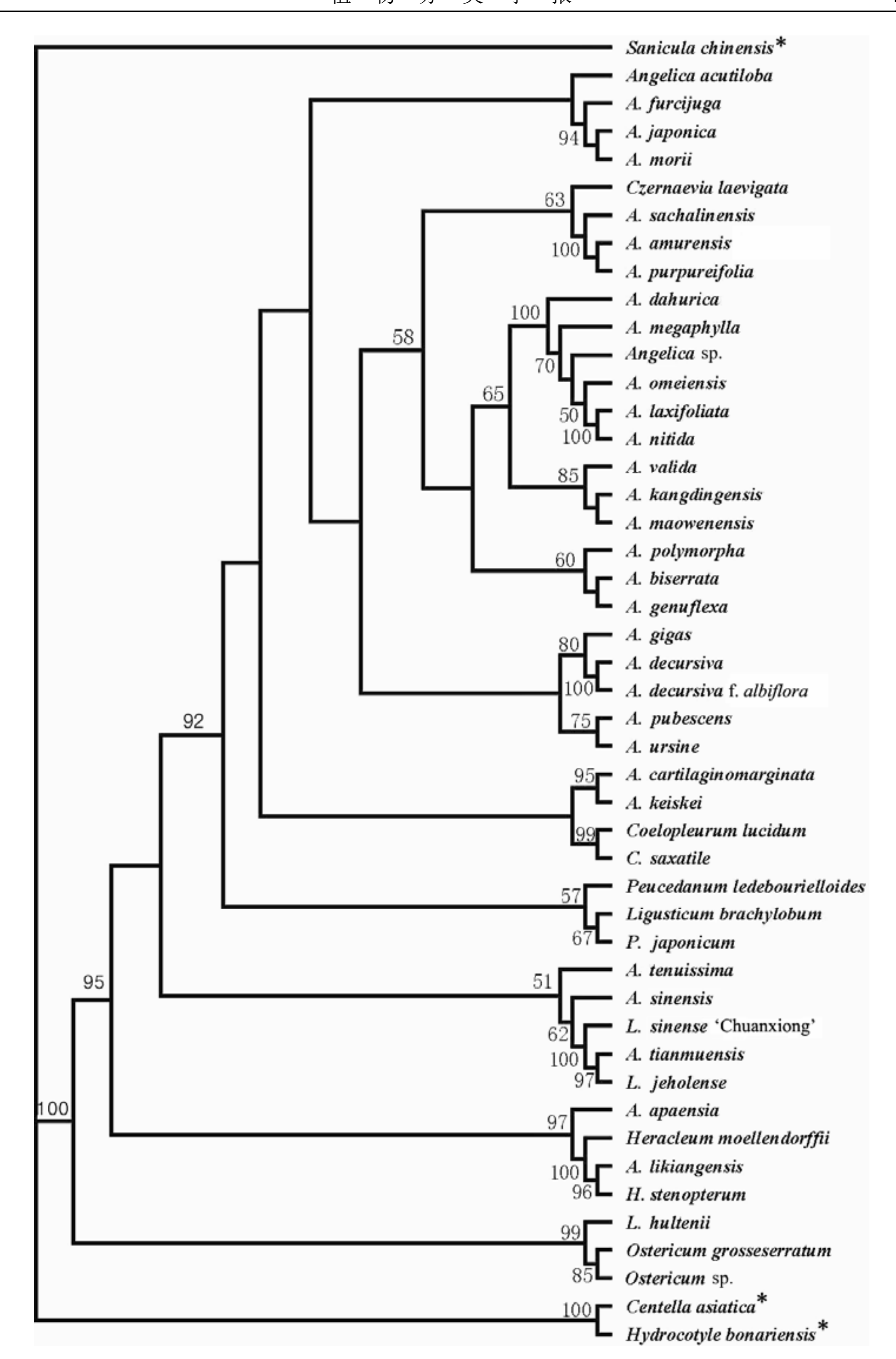


图2 用最大简约法构建的ITS (包括ITS1和ITS2)系统树(数字表示各分支自展数据支持率, *表示外类群)

Fig. 2. ITS (including ITS1 and ITS2) phylogenetic tree using the maximum parsimony method. The tree has 796 steps with *CI*=0.6382 and *RI*=0.7480. Numbers are bootstrap values. * represents the outgroup.

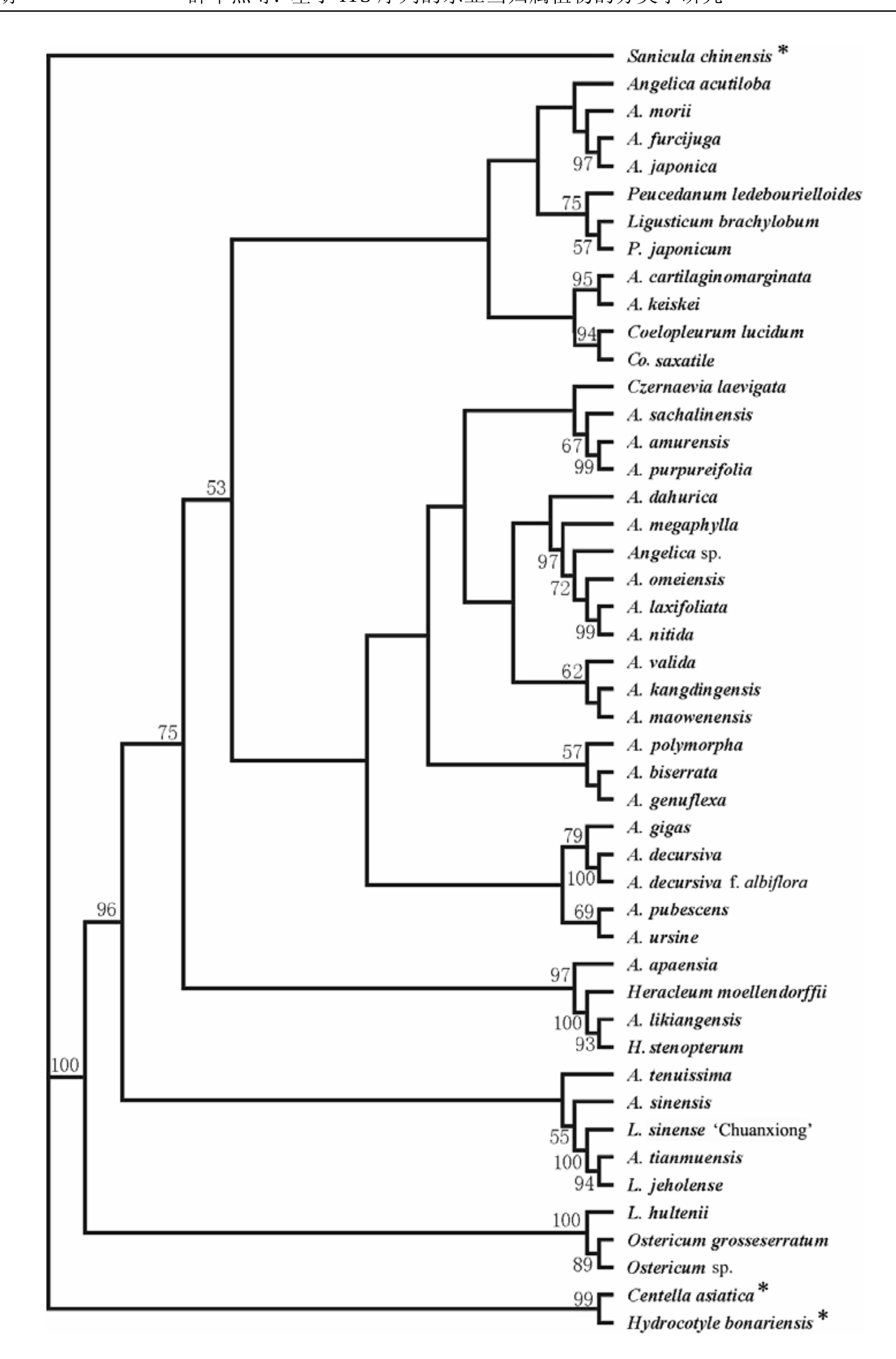


图3　用最大似然法构建的ITS (包括ITS1和ITS2)系统树(数字表示各分支自展数据支持率, *表示外类群)

Fig. 3.　ITS (including ITS1 and ITS2) phylogenetic tree using the maximum likelihood method. Numbers are bootstrap values. * represents the outgroup.

不同系统树的构建依据了不同的计算方法，如NJ树的构建依据了距离法(distance method), MP树与ML树的构建依据了独立元素法(discrete character method), 3个系统树在拓扑结构上有一定区别。但比较这3个系统树可以发现以下共同特点: 所分析的31种狭义当归属植物中，有26种狭义当归属植物与广义当归属中的高山芹属、柳叶芹属植物以及广义当归属外的前胡属植物组成一个大的分支；在这一大分支中，26种狭义当归属植物又进一步分成若干小支，虽然各小支在3个系统树上的位置并不完全一致，但组成各小分支的植物类群相同；在这一大分支中，除柳叶芹总是与狭义当归属植物聚在一个小分支中外，高山芹属、前胡属以及藁本属植物川防风等在3个系统树上均相互靠近，并与狭义当归属的长鞘当归和明日叶在空间位置上较近，位于大分支内部；同属广义当归属的山芹属植物大齿山芹和*Ostericum* sp.在这3个树中均与广义当归属内的其他植物距离较远，而与广义当归属外的藁本属植物*L. hultenii*聚成一个分支，位于整个系统树的最外侧，靠近外类群；狭义当归属中的*A. tenuissima*、当归、天目当归与藁本属的川芎和*L. jeholense*聚合成一个分支；丽江当归、阿坝当归则与独活属的两个植物*H. moellendorffii*与狭翅独活组成另一分支，在NJ树和MP树中紧靠山芹属分支位于系统树的外侧，而与绝大多数狭义当归属植物距离较远；藁本属的4种植物相互间在系统树上相距较远，而与其他属的植物相互混杂。

3 讨论

国内外对伞形科芹亚科当归属的研究，一直断断续续地进行着。20世纪90年代初，《中国植物志》伞形科卷编成出版，为有关当归属研究的物种鉴定提供了依据。在此前后，江苏省中国科学院植物研究所的潘泽惠等(潘泽慧等, 1994; 舒璞, 潘泽惠, 1997)对中国当归属植物的染色体、花粉等进行了较为详细深入的研究。不过，此类研究都是在Drude (1897)系统的框架内，即把当归属作为单起源的类群进行研究的。加之在芹亚科与当归属有关的植物中，染色体基数相同(2*n*=22)(潘泽慧, 1994)，花粉的形态特征大同小异(舒璞，余孟兰，2001)，所以这两类研究都只能提供物种进化程度相近的信息而难于提供属间或属内分类的依据。王年鹤等(1990, 1996)进一步从化学分类的角度研究显示，即使是狭义当归属，也不是一个单起源的自然分类群。国外在分子系统水平涉及当归属的少量研究又表明当归属植物与前胡属、西风芹属等另10多个属的植物相混杂，被分散在若干个次级分支中(Downie et al., 1996)。因此，当归属植物的基本分类框架体系模糊不清。

近几年来，生物体内被称为“活化石”的rDNA，因具有比cpDNA更快的进化速率，且不存在cpDNA的母系单向遗传，而被用作研究科内、属内和种间的分子演化以及物种鉴别的重要分子标记(葛颂等，1997)。我们利用ITS序列分析东亚地区广泛分布的狭义当归属以及它们的近缘属的共7属44个代表植物，根据各属间的遗传距离以及建立的3个系统树的结果显示:

1．在系统树上，大多数广义当归属的植物(包括当归属、柳叶芹属和高山芹属)都相对集中在一个大分支里，但狭义当归属与广义当归属的其他属(包括柳叶芹属和高山芹属)的植物之间没有明确的区分，显示它们之间的亲缘关系较近。这个大分支中的各狭义

当归属植物又进一步相互聚成各个小分支，这与王年鹤(1990)、Downie等(2001b)和Katz-Downie (1999)等认为狭义当归属不是单起源，而是应该分成若干组(section)的意见一致，但若要对其中各物种的具体分类地位进行确定尚需要更多的证据。

2. 当归属与山芹属是广义当归属中种类最多的两个属，对这两个属的分合历来存在分歧。《北美植物志》(Constance, 1994)和《日本伞形科植物志》(Hiroe & Constance, 1958)均将山芹属并入当归属，而《苏联植物志》(Schischk, 1951)和《中国植物志》(单人骅，佘孟兰, 1992)则将之独立成属，但仍属于广义当归属范畴；袁昌齐和单人骅(1983)、秦惠珍等(1995)根据果实的解剖特征，舒璞和佘孟兰(1997)根据花粉形态也认为山芹属应单独成属；根据化学成分分析，山芹属植物基本不含香豆素成分，而其他广义当归属植物大多含有香豆素类成分，这之间相差较大(中华本草编委会，1999)；本文根据ITS序列计算的遗传距离也发现山芹属与广义当归属的其他属相距甚远，在系统树上山芹属也处在系统树的外围，紧靠外类群。以上结果显示山芹属应当作为一个相对独立的分类群处理。至于该属是否应该被保留在当归亚族甚至前胡族，还有待于进一步扩大相关研究范围后才可做出结论。

3. 在系统树上，所选前胡属的两种植物均无一例外地位于当归属植物大分支的内部，这不仅与遗传距离的计算结果一致，也与Downie (1996)等分析的欧洲来源的前胡属植物的结果一致。化学分析结果也表明，前胡属植物含有与狭义当归属植物类似的香豆素(王年鹤, 1996)。以上结果共同显示前胡属与当归属植物之间的亲缘关系很近。

4. 在系统树上, 4种藁本属植物分别与当归属的当归和天目当归、前胡属植物以及山芹属植物聚到3个小分支中；从化学成分类型来看，这3个小分支各有自己的特点：当归分支除天目当归外，均不含香豆素，而含苯肽内酯成分；前胡分支含角型吡喃香豆素(Baba et al., 1989；中华本草编委会, 1999)；山芹分支不含上述两类成分。由此可见，化学成分分析的结果与ITS序列分析的结果一致，均支持藁本属不是一个自然类群的观点。

5. 在系统树上，狭义当归属中尚有少数几种远离主分支的植物，初步分析如下:

(1)当归：在3个系统树中，它总是与当归属的另一植物*A. tenuissima* Nakai以及藁本属的川芎、*L. jeholense*之间空间距离较近。这几种植物具有一个共同特点，即：不含有香豆素类成分，却含有大量的苯酞内酯类成分(Kim & Chi, 1989；中华本草编委会, 1999)。这种情况在当归属其他植物中是不存在的。在形态(主要是果实形态)上狭义当归属是一个变异较大的属，特征不稳定，而和藁本属的差别也不十分明显，仅仅是果实腹背扁压(当归属)或者是稍扁压(藁本属)。因此，综上分析，应当重新考虑当归的归属问题。

(2)天目当归：是伞形科中罕见的多倍体(10倍体)植物(潘泽慧等，1994)，在ITS测序时未发现有一个位点有多个峰的现象，提示该物种可能为同源多倍体。天目当归在形态上与拐芹和重齿当归相似(舒璞等，2001)，且含有与当归属植物一致的香豆素成分，但在系统树上天目当归与拐芹等含有香豆素的植物相距甚远，而聚类到不含香豆素的分支。天目当归在系统树上位置的异常是由于其特殊的多倍性(Cerbah et al., 1998)还是其他原因造成的，还有待进一步探讨。

(3)阿坝当归：其经典的分类特征有些与当归属的相似，有些又与独活属的相似，有些特征又介于当归属与独活属之间，因而其分类地位一直摇摆不定(潘泽慧等，1994；马

永红等, 2005)。虽然在系统树上阿坝当归与独活属植物距离较近, 而与狭义当归属多数植物相距较远。但进一步仔细分析ITS1和ITS2序列却发现, 其ITS1部分拥有当归属的序列特征, ITS2部分拥有独活属的序列特征, 因此认为阿坝当归的分类地位介于当归属和独活属之间(薛华杰等, 2007)。

(4)丽江当归: 虽然拥有当归属的典型形态特征, 在系统树上却与阿坝当归以及独活属植物聚成一个分支。从化学成分分析, 丽江当归与独活属植物共同拥有角型呋喃香豆素(王年鹤等, 1996), 但同样含有角型呋喃香豆素的重齿当归却在当归属分支内部。为何基于ITS序列分析丽江当归会聚类到独活分支, 还有待进一步研究。

参 考 文 献

Baba K, Yoneda Y, Kozawa M, Fujita E, Wang N, Yuan C. 1989. Studies on Chinese traditional medicine "Fang-Feng" (Ⅱ): Comparison of several Fang-Feng by coumarins, chromones and polyacetylenes. Shoyakugaku Zasshi 43 (3): 216.

Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier M, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S. 1998. Molecular phylogeny of the genus *Hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. Molecular Biology and Evolution 15: 345–354.

Chen X-Y (陈晓亚). 1989. Numerical analysis of fruit characters of *Angelica* L. and related genera. Journal of Nanjing University (Natural Science) (南京大学学报自然科学版) 25 (3): 121–130.

Constance M L. 1994. North American Flora. New York: New York Botanical Garden Press. 91–130.

Douzery E J P, Pridgeon A M, Kores P, Linder H P, Kurzweil H, Chase M W. 1999. Molecular phylogenetics of Diseae (Orchidaceae): A contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. American Journal of Botany 86: 887–899.

Downie S R, Downie D S, Cho K J. 2001a . Relationships among "Ancient Araliads" and their significance for the systematics of Apiales. Molecular Phylogenetics and Evolution 19: 259–276.

Downie S R, Katz-Downie D S, Cho K. 1996. Phylogenetic analysis of Apiaceae subfamily Apioideae using nucleotide sequences from the chloroplast *rpoC1* intron. Molecular Phylogenetics and Evolution 6: 1–18.

Downie S R, Plunkett G M, Watson M F, Spalik K, Katz-Downie D S, Valiejo-Roman C M, Terentieva E I, Troitsky A V, Lee B, Lahham J, Eloolah A. 2001b. Tribes and clades within Apiaceae subfamily Apioideae: the contribution of molecular data. Edinburgh Journal of Botany 58: 301–330.

Drude O. 1897. Umbeliferae. In: Engler A, Prantl K, Engler A, Prantl K eds. Die Naturlichen Pflanzenfamilien 3. Engelan: Lerpzig.

Editorial Board of Zhong Hua Ben Cao of State Administration of Traditional Chinese Medicine (中华本草编委会) ed. 1999. Chinese Ben Cao (中华本草). Shanghai: Shanghai Science & Technology Publishers. 5: 893–1006.

Ge S (葛颂), Schaal B A, Hong D-Y (洪德元). 1997. A reevaluation of the status of *A. lobophylla* based on ITS sequence, with reference to the utility of ITS sequence in *Adenophora*. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 35: 385–395.

Hiroe M, Constance L. 1958. *Umbelliferae* of Japan. Berkeley: University of California Press.

Katz-Downie D S, Valiejo-Roman C M, Terentieva E I, Troitsky A V, Pimenov M G, Lee B, Downie S R. 1999. Towards a molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: Additional information from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. Plant Systematic Evolution 216 (3–4): 167–195.

Kim H S, Chi H J. 1989. Studies on essential oils of plants of *Angelica* genus in Korea (II): Essential oils of the root of *Angelica tenuissima*. Saengyak Hakhoechi 20: 13–20.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5: 150–163.

Ma Y-H (马永红), He X-J (何兴金), Zhao Y (赵颖), Meng D-Y (孟德玉), Wang C-B (王长宝). 2005. The phylogeny and the geographical temperate characteristic of *Heracleum* and *Angelica* in China. Chinese Wild Plant Resources (中国野生植物资源) 24 (2): 18–30.

Pan Z-H, Watson M F. 2005. *Angelica*. In: Wu Z-Y, Raven P H eds. Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 14: 160.

Pan Z-H (潘泽慧), Zhuang T-D (庄体德), Yao X-M (姚欣梅), Sheng N (盛宁). 1994. A study on karyotypes

and geographical distribution of *Angelica* and related genera (Umbelliferae) in China. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 32: 419–424.

Plunkett G M, Lowry P P. 2001. Relationships among "Ancient Araliads" and their significance for the systematics of Apiales. Molecular Phylogenetics and Evolution 19: 259–276.

Qin H-Z (秦慧贞), Li B-Y (李碧媛), Wu Z-J (吴竹君), Pan Z-H (潘泽惠). 1995. On the fruit anatomy of *Angelica* L. (s.l.) of East Asia and North America and its evolution. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica (西北植物学报) 15: 48–54.

Schischk B K. 1951. Umbelliferae. In: Komarov V L. Flora of URSS. Leningrad: Akademia Nauk SSSR. 17: 10–22.

Sheh M-L (佘孟兰), Shu P (舒璞), Pan Z-H (潘泽惠). 1997. The comparative study of pollen morphology of *Angelica* L. between East Asia and North America. Journal of Plant Resources and Environment (植物资源与环境) 6 (1): 41–47.

Shan R-H (单人骅), Sheh M-L (佘孟兰). 1992. *Angelica*. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press. 15 (3): 1–79.

Shu P (舒璞), Pan Z-H (潘泽惠), Liu X-T (刘心恬), Zhuang T-D (庄体德). 2001. Pollen morphology and chromosome number of *Angelica tianmuensis* and its relationship with related species. Journal of Plant Resources and Environment (植物资源与环境学报) 10 (4): 29–33.

Shu P (舒璞), She M-L (佘孟兰). 2001. Pollen photographs and flora of Umbelliferae in China (中国伞形科植物花粉图志). Shanghai: Shanghai Science & Technology Publishers.

Sun F J, Downie S R, Hartman R L. 2004. An ITS-based phylogenetic analysis of the perennial, endemic Apiaceae subfamily Apioideae of Western North America. Systematic Botany 29: 419–431.

Swofford D L. 2003. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods, ver. 4.0b10). Sunderland, MA, USA.

Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25: 4876–4882.

Xue H-J (薛华杰), Wang N-H (王年鹤), Lu C-M (陆长梅), Sun M-Y (孙明义), Baba K, Taniguchi M. 2007. Phylogenetic position of *Angelica apaensis/Heracleum apaense* based on evidence from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Journal of Wuhan Botanical Research (武汉植物学研究) 25: 143–148.

Wang N-H (王年鹤). 1990. The chemical constitutes taxonomic study of Apioideae. In: Editorial Board of Bulletin of Nanjing Botanical Garden Mem. Sen Yat-Sen eds. Bulletin of Nanjing Botanical Garden Mem. Sen Yat-Sen. Nanjing: Jiangsu Science & Technology Publishing House. 1–5.

Wang N-H (王年鹤), Baba K, Taniguchi M. 1996. Simple and convenient application of ^{1}H-NMR method in the chemotaxonomy of Apioideae. Journal of Plant Resources and Environment (植物资源与环境学报) 5 (2): 40–44.

White T J, Bruns T, Les S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J eds. PCR Protocols: a Guide to Methods and Application. San Diego: Academic Press. 315–322.

Yuan C-Q (袁昌齐), Shan R-H (单人骅). 1983. On the genera *Angelica* L. and *Ostericum* Hoffm. (Umbelliferae) in China. In: Editorial Board of Bulletin of Nanjing Botanical Garden Mem. Sen Yat-Sen eds. Bulletin of Nanjing Botanical Garden Mem. Sen Yat-Sen. Nanjing: Jiangsu Science & Technology Publishing House. 1–13.